

特許協力条約に基づく国際出願願書

JP0304SKK

原本（出願用） - 印刷日時 2003年10月08日（08.10.2003）水曜日 17時15分51秒

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	
0-4	様式-PCT/R0/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 0-4-1 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.07.2003)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (R0/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	JP0304SKK
I	発明の名称	GLP-1誘導体及びその経粘膜吸収型製剤
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	株式会社 三和化学研究所
II-4en	Name	SANWA KAGAKU KENKYUSHO CO., LTD.
II-5ja	あて名:	461-8631 日本国 愛知県 名古屋市東区東外堀町 35番地
II-5en	Address:	35, Higashisotobori-cho Higashi-ku Nagoya-shi, Aichi 461-8631 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
II-8	電話番号	052-951-8130
II-9	ファクシミリ番号	052-950-1860

III-1 III-1-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	
III-1-4j a	氏名 (姓名)	林 祐二
III-1-4e n	Name (LAST, First)	HAYASHI, Yuji
III-1-5j a	あて名:	461-8631 日本国 愛知県 名古屋市東区東外堀町 3 5 番地 株式会社三和化学研究所内
III-1-5e n	Address:	c/o SANWA KAGAKU KENKYUSHO Co., LTD. 35, Higashisotobori-cho, Higashi-ku Nagoya-shi, Aichi 461-8631 Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-2 III-2-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	
III-2-4j a	氏名 (姓名)	牧野 充弘
III-2-4e n	Name (LAST, First)	MAKINO, Mitsuhiro
III-2-5j a	あて名:	461-8631 日本国 愛知県 名古屋市東区東外堀町 3 5 番地 株式会社三和化学研究所内
III-2-5e n	Address:	c/o SANWA KAGAKU KENKYUSHO CO., LTD. 35, Higashisotobori-cho, Higashi-ku Nagoya-shi, Aichi 461-8631 Japan
III-2-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-2-7	住所 (国名)	日本国 JP

III-3 III-3-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-3-4j a	氏名(姓名)	幸崎 敏之
III-3-4e n	Name (LAST, First)	KOUZAKI, Toshiyuki
III-3-5j a	あて名:	461-8631 日本国 愛知県 名古屋市東区東外堀町 3 5 番地 株式会社三和化学研究所内
III-3-5e n	Address:	c/o SANWA KAGAKU KENKYUSHO CO., LTD. 35, Higashisotobori-cho, Higashi-ku Nagoya-shi, Aichi 461-8631 Japan
III-3-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-3-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-4 III-4-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-4-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-4-4j a	氏名(姓名)	武田 基宏
III-4-4e n	Name (LAST, First)	TAKEDA, Motohiro
III-4-5j a	あて名:	461-8631 日本国 愛知県 名古屋市東区東外堀町 3 5 番地 株式会社三和化学研究所内
III-4-5e n	Address:	c/o SANWA KAGAKU KENKYUSHO CO., LTD. 35, Higashisotobori-cho, Higashi-ku Nagoya-shi, Aichi 461-8631 Japan
III-4-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-4-7	住所 (国名)	日本国 JP

III-5 III-5-1	その他の出願人又は発明者 この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only)
III-5-2 III-5-4j a III-5-4e n III-5-5j a	右の指定国についての出願人である。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名:	城森 孝仁 JOMORI, Takahito 461-8631 日本国 愛知県 名古屋市東区東外堀町 35番地 株式会社三和化学研究所内 c/o SANWA KAGAKU KENKYUSHO CO., LTD. 35, Higashisotobori-cho, Higashi-ku Nagoya-shi, Aichi 461-8631 Japan
III-5-5e n	Address:	
III-5-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-5-7	住所 (国名)	日本国 JP
IV-1 IV-1-1ja IV-1-1en IV-1-2ja IV-1-2en IV-1-3 IV-1-4 IV-1-5	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。 氏名(姓名) Name (LAST, First) あて名: Address: 電話番号 ファクシミリ番号 電子メール	代理人 (agent) 小林 洋平 KOBAYASHI, Youhei 511-0821 日本国 三重県 桑名市 矢田261番地6号 Yada 261-6 Kuwana-shi, Mie 511-0821 Japan 0594-21-2932 0594-21-2933 yohe-k@f3.dion.ne.jp
V V-1	国の指定 広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを求める場合には括弧内に記載する。)	AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM ZW 及びハラレプロトコルと特許協力条約の締約国である他の国 EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM 及びユーラシア特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 EP: AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国である他の国 OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG 及びアフリカ知的所有権機構と特許協力条約の締約国である他の国

特許協力条約に基づく国際出願願書

JP0304SKK

原本（出願用） - 印刷日時 2003年10月08日（08.10.2003）水曜日 17時15分51秒

V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE EG ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて 、規則4.9(b)の規定に基づき、 特許協力条約のもとで認められ る他の全ての国の指定を行う。 ただし、V-6欄に示した国の指 定を除く。出願人は、これらの 追加される指定が確認を条件と していること、並びに優先日か ら15月が経過する前にその確認 がなされない指定は、この期間 の経過時に、出願人によって取 り下げられたものとみなされる ことを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権 主張	
VI-1-1	出願日	2002年10月11日 (11.10.2002)
VI-1-2	出願番号	特願2002-299283
VI-1-3	国名	日本国 JP
VII-1	特定された国際調査機関 (IS A)	日本国特許庁 (ISA/JP)
VIII	申立て	申立て数
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	-
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国 際出願日における出願人の資格 に関する申立て	-
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国 際出願日における出願人の資格 に関する申立て	-
VIII-4	発明者である旨の申立て (米国 を指定国とする場合)	-
VIII-5	不利にならない開示又は新規性 喪失の例外に関する申立て	-
IX	照合欄	用紙の枚数
IX-1	願書 (申立てを含む)	6
IX-2	明細書 (配列表を除く)	21
IX-3	請求の範囲	1
IX-4	要約	1
IX-5	図面	0
IX-7a	国際出願に含まれる用紙の枚数 (明細書の配列表を除く)	29
IX-6	明細書の配列表	18
IX-7	合計	47

EZABST00.TXT

特許協力条約に基づく国際出願願書

JP0304SKK

原本（出願用） - 印刷日時 2003年10月08日（08.10.2003）水曜日 17時15分51秒

	添付書類	添付	添付された電子データ
IX-8	手数料計算用紙	✓	-
IX-9	個別の委任状の原本	✓	-
IX-16	コンピュータ読み取り可能なヌクレオチド又はアミノ酸配列表		
IX-16 - (i)	規則13の3に基づき提出する 国際調査のための写し（国際 出願の一部を構成しない）	-	1 フレキシブルディスク
IX-17	PCT-EASYディスク	-	フレキシブルディスク
IX-19	要約書とともに提示する図の 番号		
IX-20	国際出願の使用言語名:	日本語	
X-1	提出者の記名押印		
X-1-1	氏名(姓名)	小林 洋平	

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面:	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

PCT手数料計算用紙(願書付属書)

JP0304SKK

原本(出願用) - 印刷日時 2003年10月08日 (08.10.2003) 水曜日 17時15分51秒

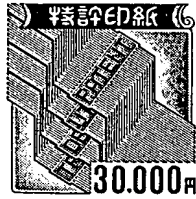
[この用紙は、国際出願の一部を構成せず、国際出願の用紙の枚数に算入しない]

0	受理官庁記入欄			
0-1	国際出願番号			
0-2	受理官庁の日付印			
0-4	様式-PCT/RO/101 (付属書) このPCT手数料計算用紙は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.07.2003)		
0-9	出願人又は代理人の書類記号	JP0304SKK		
2	出願人	株式会社 三和化学研究所		
12	所定の手数料の計算	金額/係数	小計 (JPY)	
12-1	送付手数料 T	⇒	18,000	
12-2-1	調査手数料 S	⇒	72,000	
12-2-2	国際調査機関	JP		
12-3	国際手数料 基本手数料 (最初の30枚まで) b1	54,000		
12-4	30枚を越える用紙の枚数	17		
12-5	用紙1枚の手数料 (X)	1,200		
12-6	合計の手数料 b2	20,400		
12-7	b1 + b2 = B	74,400		
12-8	指定手数料 国際出願に含まれる指定国 数	98		
12-9	支払うべき指定手数料の数 (上限は5)	5		
12-10	1指定当たりの手数料 (X)	11,600		
12-11	合計の指定手数料 D	58,000		
12-12	PCT-EASYによる料金の減 額 R	-16,600		
12-13	国際手数料の合計 (B+D-R) I	⇒	115,800	
12-17	納付すべき手数料の合計 (T+S+I+P)	⇒	205,800	
12-19	支払方法	送付手数料: 特許印紙 調査手数料: 特許印紙 国際手数料: 郵便口座への振込み 優先権証明書請求手数料:		

EASYによるチェック結果と出願人による言及

13-2-3	EASYによるチェック結果 氏名(名称)	Yellow 出願人 1: 日本語による気付が記入されていません。
13-2-7	EASYによるチェック結果 内訳	Green? 国際出願に図面が含まれていませんが、よろしい ですか?

		Green? 優先権の主張 1: 優先権証明書が添付されていません。(優先権主張日から16ヶ月以内に提出しなければなりません。)
13-2-11	EASYによるチェック結果 受理官庁/国際事務局記入欄	Green? この願書を作成したPCT-EASYは英語版ないし西欧言語版以外のWindows上で動作しています。ASCII文字以外の文字について、願書と電子データを注意して比較してください。



送付手数料・調査手数料

90,000 円

百五キャッシュサービス利用明細票

いつもご利用ありがとうございます。ご利用明細票は必ずお持ち帰りいただきますようお願い申し上げます。

取扱日		取扱店	機番	取引通番
15-10- 8		103	558	3564
銀行番号	支店番号	口座番号		通帳 使用
0155	0103	110010265105		
お取引内容			お取引金額 円	
振込予約			115,800	
お取扱できないとき			お取引後残高 円	
			390,679	
お取引時刻				ご利用手数料 円
17:46				577
お振込の明細またはご案内				
東京三菱銀行				
虎ノ門支店				
普通 2074896				
WIPO-PCT GENEVA 様				
＼＼＼リシ コハ＼＼＼ヤシヨウ＼＼ 様				
お電話		0594-21-2932		
照会番号＊		558-00002		
お振込取扱日		15-10- 9 (木)		

☒ 百五銀行

印洋士

基本手数料	74,400 円
指定手数料	58,000 円
PCT-EASYによる料金の減額	- 16,600 円
合 計	115,800 円

陳 述 書

特許庁長官 殿

本書に添付したフレキシブルディスクに記録した塩基配列またはアミノ酸配列は、明細書に記載した塩基配列またはアミノ酸配列を忠実にコード化したものであって、内容を変更したものでないことを陳述します。

2003年（平成15年）10月9日

国際出願の表示
書類記号

平成15年10月9日提出の国際出願
J P 0 3 0 4 S K K

発明の名称

G L P - 1 誘導体及びその経粘膜吸収型製剤

代理人

弁理士 小林 洋平
KOBAYASHI Youhei

印

磁気ディスクの記録形式等の情報を記載した書面

- 1 出願人名称 株式会社 三和化学研究所
 SANWA KAGAKU KENKYUSHO CO.,LTD.
- 2 代理人氏名 小林 洋平 KOBAYASHI Youhei
- 3 国際出願の表示 平成15年10月9日提出の国際出願
書類記号 JP0304SKK
- 4 発明の名称 GLP-1誘導体及びその経粘膜吸収型製剤
- 5 使用した文字コード ASCIIコード
- 6 配列を記録したファイル名 JP0304SKK_seq.txt
- 7 連絡先
 電話番号 0594-21-2932
 担当者氏名 小林 洋平

明 細 書

GLP-1 誘導体及びその経粘膜吸収型製剤

5 技術分野

本発明は、口腔、肺、鼻、あるいは腸などの粘膜から吸収される割合の高い、ヒトグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の新規誘導体、およびその製造と利用方法に関する。

10 背景技術

GLP-1 (Glucagon like peptide-1) は、食物摂取により消化管より分泌され、膵臓に働きインスリン分泌を刺激するインクレチンホルモンとして知られている。同様の作用を示すものには、GIP (Gastric inhibitory polypeptide または Glucose-dependent insulinitropic polypeptide) がある。2 型糖尿病患者では、
15 健常人に比べ、このインクレチン効果が欠如しているかもしくは障害されていることが示唆されていて、これが高血糖の成因の一つと考えられている。例えば、2 型糖尿病患者では血中 GLP-1 濃度が低下し、GIP は健常人と変わらないことが報告されている。また、2 型糖尿病患者へのインクレチンホルモン投与試験の結果、インスリン分泌促進反応が健常人に比べて、GLP-1 投与では差違は認めない
20 が、GIP 投与で顕著に低下していることが報告されている。このため、糖尿病患者では GLP-1 に対する応答性は維持されているので、不足を補う GLP-1 製剤は、インスリン分泌促進剤としての糖尿病治療薬としての応用に期待が持たれている。

GLP-1 のインスリン分泌作用の特徴は、血糖値が 110 mg/dl 以下ではインスリン分泌を刺激せず、それ以上の血糖値になってはじめてインスリン分泌させると
25 という血糖値依存性を表すことである。すなわち、GLP-1 の投与により、血糖値に応じてインスリン分泌が促進され、血糖値が正常以下になるとインスリン分泌は

起こらない。したがって GLP-1 を使用した場合、低血糖の心配がないこと、またインスリンの過剰な分泌がなく膵臓を疲弊させないことが大きな臨床上のメリットである。一方、2 型糖尿病の治療において中心的に使用されているスルフォニル尿素剤は、持続的に ATP 感受性 K^+ チャンネルを閉鎖しインスリン分泌を促進させる。しかし、血糖値とは無関係に膵臓のインスリン分泌細胞に働くため、低血糖、 β 細胞への過剰な刺激による膵臓の疲弊、長期投与による 2 次無効が報告されている。したがって、GLP-1 の薬理学的特性は、従来の糖尿病薬とは異なる有用なものである。

また GLP-1 には、グルカゴン分泌を抑制する特性、食物の胃からの排泄を遅らせる特性、胃酸分泌を抑制する特性、脳に作用して摂食を抑制する特性、さらには膵臓 β 細胞でのインスリン合成や膵臓 β 細胞の増殖を促進する特性がある。したがって、GLP-1 は、2 型糖尿病における高グルカゴン血症等の高血糖の成因に拮抗し、糖尿病の治療に有用であるだけでなく、肥満治療にも有効と考えられている。

しかしながら、GLP-1 の活性本体は GLP-1 (7-36) amide あるいは GLP-1 (7-37) のポリペプチドであり、GLP-1 の経口摂取では消化管内で消化酵素により消化・分解され、吸収されない。このため臨床では、点滴による静脈内注射や皮下注射が試みられているのが現状である。しかも、血中や組織に存在するジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP-IV) によって GLP-1 は分解を受け、生体内半減期は 1 ~ 2 分と非常に短いことが知られており、これらが臨床応用へのネックになっている。

この問題点を解決するために、いくつかの研究開発が行われている。例えば、分解されにくく半減期の長い、8 位アミノ酸置換誘導体 (Diabetologia 41: 271-278(1998), Biochem 40: 2860-2869(2001)) や、皮下からの吸収が遅い徐放型注射剤の開発が試みられている。また、GLP-1 様アゴニスト活性をもち、血中半減期の長いトカゲ由来の合成 Exendin-4 での注射剤の開発 (Am J Physiol 281:E155-E161(2001)) が行われている。しかし、GLP-1 が糖尿病治療薬として広

く用いられるためには、患者の負担や利便性を考慮すると、注射以外の投与経路が望ましい。

注射剤や経口投与剤に代えて、侵襲性を伴わない投与方法として、肺、口腔、鼻腔、膣、眼、直腸などの粘膜吸収剤が考えられる。しかし、一般に GLP-1 のようなペプチドは高分子であるため、単独での粘膜からの吸収率は低い。このため、一般的には、ペプチドのような高分子は、吸収促進剤とともに処方される。また、薬剤の持続吸収性を確保するには、水溶性あるいは水膨潤性の接着剤が使用され、皮膚層に付着するフィルム、バツカル錠、軟膏、トローチの形態で処方される。これまでに多くの吸収促進剤あるいは接着剤が試験され、粘膜薬物投与を容易にする上で有効であることが見出されている。しかしながら、Gutniak ら (Diabetes Care 20:1874-1879 (1997)) により報告された、400 μ g の GLP-1 を含むバツカル錠でのヒト口腔粘膜からの GLP-1 の吸収は、前記のような従来技術を駆使しても、静脈内注射の 7%、皮下注射の 47% のバイオアベイラビリティ（生物学的利用率）であり、その吸収率は十分とはいえない。

尚、GLP-1 を分解する酵素として知られるジペプチジルペプチダーゼ IV は、腎臓、肝臓、小腸、唾液腺、各種結合組織など広く組織に分布する他、血液、尿、唾液などの体液や鼻腔粘膜にも存在することが明らかになっており、おそらく他の粘膜組織にも存在することが推測される。

20 発明の開示

GLP-1 の粘膜からの吸収は、膜透過性の低さや吸収部位での分解により、注射に比べ非常に非効率的である。例えば、GLP-1 を経鼻投与することは可能であるが、その吸収率が低いために、十分な薬理効果を得るためには、非常に高用量が必要である。したがって、ペプチドの原体生産コストの面から、天然型 GLP-1 を経鼻剤として医薬品開発することは非現実的である。GLP-1 を臨床応用するためには、粘膜からの吸収率が注射剤に匹敵する GLP-1 誘導体の開発が必要である。

そこで、本発明者らは、粘膜からの吸収性が改善された GLP-1 新規誘導体を考案し、注射剤に代わる粘膜投与剤を提供すべく、鋭意研究を行った。

その結果、GLP-1 にプラスの電荷をもつアルギニンまたはリジンを付加すれば粘膜吸収が増大するとの新規な思想に至った。加えて、活性発現に重要な N 末端側を避け、C 末端側に数個のアルギニンまたは／及びリジンを付加することを考案し、下記 GLP-1 誘導体を得た。また、更に粘膜吸収率を増大させるために、表面電荷をマイナスに調整した電荷調整脂肪乳剤を利用して、粘膜吸収が著しく増大した GLP-1 製剤を創出した。

即ち、本発明の GLP-1 誘導体は、GLP-1 (7-35) のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換または／及び付加された配列からなり、かつ GLP-1 活性を有するペプチドの C 末端に $Waa-(Xaa)_n-Yaa$ (Waa は Arg または Lys、 Xaa は Arg または Lys、 n は 0~14 の整数、 Yaa は Arg、Arg-NH₂、Lys、Lys-NH₂ または Hse) が付加されたペプチドである。このように、C 末端側に数個のアルギニンまたは／及びリジンを付加することにより、粘膜からの吸収性の高い、すなわち粘膜からの生物学的利用率の高い新規 GLP-1 誘導体が提供される。

本発明の GLP-1 誘導体においては、ジペプチジルペプチダーゼ IV に対する耐性を付加するために、8 位のアラニンをセリンに置換するのが好ましい。そのようなペプチドは、一般式、 $[Ser^8]-GLP-1(7-35)-Waa-(Xaa)_n-Yaa$ (式中、 Waa は Arg または Lys、 Xaa は Arg または Lys、 n は 0~14 の整数、 Yaa は Arg、Arg-NH₂、Lys、Lys-NH₂ または Hse) で示される。

また、本発明の GLP-1 誘導体においては、26 位のリジンをグルタミンに、34 位のリジンをアスパラギンに置換することにより、トリプシン耐性を持たせることができる。そのようなペプチドは、一般式、 $[Gln^{26}, Asn^{34}]-GLP-1(7-35)-Waa-(Xaa)_n-Yaa$ (式中、 Waa は Arg または Lys、 Xaa は Arg または Lys、 n は 0~14 の整数、 Yaa は Arg、Arg-NH₂、Lys、Lys-NH₂ または Hse) で示される。

これらジペプチジルペプチダーゼ IV 耐性又はトリプシン耐性の GLP-1 誘導体に

においても、勿論、GLP-1(7-35)のアミノ酸配列中の、1もしくは数個のアミノ酸の欠失、置換または／及び付加が可能である。

前述の本発明の GLP-1 誘導体においては、好ましくは、 n は 1～9 の整数であり、更に好ましくは、 n は 3～5 の整数である。

- 5 本発明の GLP-1 誘導体において、最も好ましいペプチドは、一般式、
[Ser⁸, Gln²⁶, Asn³⁴]－GLP-1(7-35)－(Arg) n －Yaa 式中、 n は 4～6 の整数、Yaa
は Arg または Arg-NH₂ で示される

- 本発明の GLP-1 誘導体をマウスに経鼻投与後、耐糖能試験を行い、血糖低下作用およびインスリン分泌促進作用により GLP-1 誘導体の吸収効率を調べた。その
10 結果、高い血糖低下作用およびインスリン分泌促進作用を示し、天然型 GLP-1 の
10 分の 1 用量で同等の効果を示したことから、鼻粘膜からの吸収が天然型 GLP-1
に比べて 10 倍増大したと推測される。

- 本発明の GLP-1 誘導体は、さらにその吸収率を高めるために、特開平 8-27018
に記載の電荷調整脂肪乳剤を用いて製剤化を行った。即ち、本発明は、表面電荷
15 をマイナスに調整した脂肪乳剤と本発明の GLP-1 誘導体とを含有する GLP-1 製剤
をも提供する。

- 電荷調整脂肪乳剤は表面電荷をマイナスに調整した脂肪乳剤で、ペプチドおよび蛋白質を吸着し、ペプチドおよび蛋白質の対酵素安定性を向上させ、さらには薬理効果の増強と持続時間の延長がもたらされると考えられている。一方、本発
20 明の GLP-1 誘導体は、プラスの荷電をもつアルギニンまたはリジンが数個付加されているので、前記電荷調整脂肪乳剤に吸着されやすくなっている。したがって、
この電荷調整脂肪乳剤を用いて製剤化すれば、本発明の GLP-1 誘導体の粘膜吸収はより増大することが推測される。実際に、グルコース負荷マウスに対し、前記電荷調整脂肪乳剤を併用して本発明の GLP-1 誘導体を経鼻投与し、血糖低下作用
25 により吸収効率を調べたところ、本発明の GLP-1 誘導体は、天然型 GLP-1 の 30
分の 1 用量で同等の効果を示した。即ち、本発明の GLP-1 誘導体は、電荷調整脂

肪乳剤を併用することにより、天然型 GLP-1 に比べて鼻粘膜からの吸収が 30 倍増大しているものと考えられる。

このように、本発明の GLP-1 誘導体は、粘膜吸収性が高く、特に鼻粘膜から吸収させる製剤とするのに最適なペプチドである。本発明の GLP-1 誘導体は、8 位をセリンに置換することにより、血中や組織に存在するジペプチジルペプチダーゼ IV による分解を受けにくくなり、生体内半減期の長い GLP-1 誘導体とすることができる。更に、前述のように、トリプシン耐性を付加することで、組織中に存在するトリプシンによる分解からも保護され、生物学的利用率を更に高めることができる。

また、本発明の GLP-1 誘導体と電荷調製脂肪乳剤とを組み合わせることにより、更に粘膜吸収性が向上し、皮下注射剤並みの低用量で効果を発現させることができる。すなわち、本発明は、従来の注射剤に代わる、投与が容易で苦痛を伴わない粘膜吸収型 GLP-1 製剤の臨床応用の可能性を格段に高めるものであり、糖尿病患者および肥満患者の QOL の改善に役立つものと考えられる。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明を更に詳細に説明する。GLP-1 (7-35) は、His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly (配列番号 1) で示される配列を持つペプチドである。[Ser⁸]は前記配列の 2 番目、即ち 8 位の Ala が Ser に変換されていることを示し、8S と同義である。さらに、-NH₂ はアミド化されていることを示し、本発明の GLP-1 誘導体は、C 末端がアミド化されている場合とアミド化されていない場合のいずれか一方の形態をとることが可能である。

本発明の GLP-1 誘導体は、化学合成あるいは遺伝子組換え技術により製造することができる。

ポリペプチドの化学合成の原理は、本発明の技術分野において周知である。そ

の原理は、例えば、以下の様な一般のテキストを参考にできる ; Dugas H. 及び Penney C, Bioorganic Chemistry (1981) Springer-Verlag, New York, 54-92 頁、 Merrifields JM, Chem. Soc, 85:2149(1962) 及び Stewart 及び Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 24-66 項, Freeman (San Francisco, 1969)。例えば、430A

5 ペプチド合成機 (PE-Applied Biosystems Inc, 850 Lincoln Center Drive, Foster City CA 94404) 及び PE-Applied Biosystems により供給された合成サイクルを用いて、固相方法により本発明のペプチドを合成できる。Boc アミノ酸及びその他の試薬は、PE-Applied Biosystems 及び他の薬品供給業者から購入可能である。

本発明のペプチドを遺伝子組換え技術により生産する方法について、以下に詳細に説明する。

10

GLP-1 の DNA は、全合成、又はより大きな天然のグルカゴンがコードしている DNA の修飾により得られる。プレプログルカゴンをコードしている DNA 配列は Lund ら [Proc Natl Acad Sci USA 79:345-349(1982)] において示されており、この天然の配列を変えることにより、本発明化合物の生産に使用することができる。合

15 成遺伝子の構築方法は本発明の技術分野では周知であり、例えば Brown らの Methods in Enzymology, Academic Press, NY 第 68 巻、109-151 頁を参照できる。本発明のペプチドをコードする DNA 配列をそのアミノ酸配列に基づいてデザインし、Model 380A 又は 380BDNA 合成機 (PE-Applied Biosystems Inc, 850 Lincoln Center Drive, Foster City CA 94404) などの通常の DNA 合成機を用いてその配

20 列自身をもつ DNA を製造できる。

また、本発明の GLP-1 誘導体の産生に用いる DNA には、発現量を高め産物を宿主内に安定的に蓄積させる工夫、生産後の精製を容易にする工夫、あるいは融合タンパクとして生産させ容易に GLP-1 誘導体を切り出す工夫等を施すことができる。例えば、本発明の GLP-1 誘導体遺伝子の複数個をタンデムに繋ぎ、発現量を

25 高めるといった手法、または、 β -ガラクトシダーゼ、 β -ラクタマーゼ、プロテイン A、TrpE などのタンパクの遺伝子に繋ぎ、融合タンパクとして産生させると

いった手法が例示される。これらの場合、例えば、産生後 GLP-1 誘導体を単体として得るには、各遺伝子との間にアミノ酸のメチオニンに対応する遺伝子を入れておき、臭化シアン処理することができる。この場合に、C 末端は Hse (ホモセリン) になる。また、本発明の GLP-1 誘導体の中には、C 末端のみにアルギニンをもつものがあり、アルギニルエンドペプチダーゼによる酵素処理により、GLP-1 誘導体の単体を得ることができる。

GLP-1 誘導体ペプチドの発現を効果的に行うためには、適切な制限エンドヌクレアーゼを用いて、適切な組換え DNA 発現ベクターに所定の配列をもつ合成 DNA を挿入する。一般には Maniatis ら、(1989) Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, NY 第 1-3 巻を参照できる。その際、合成遺伝子の効率的な転写を達成するために、それをプロモーター-オペレーター領域と機能的に結合させる。合成遺伝子プロモーター-オペレーター領域を合成遺伝子の ATG 開始コドンに関して同じ配列の配向性にて配置する。原核細胞及び真核細胞の形質転換に使用できる種々の発現ベクターは周知であり、The Promega Biological Research Products Catalogue 及び The Stratagene Cloning Systems Catalogue が参照できる。

GLP-1 誘導体ペプチドのための発現ベクターを構築した後、そのベクターを用いて適切な宿主細胞を形質転換させる。宿主細胞には真核性細胞又は原核性細胞のいずれかを使用できる。細胞を形質転換するための技術は本分野において周知であり、上記の Maniatis らの様な一般の引用文献に見出すことができる。原核性宿主細胞は、一般にはより高い割合でタンパク質を生産し、より培養し易い。高レベルの細菌発現系において発現されるタンパク質は特徴的に凝集して、高レベルの過剰に発現されたタンパク質を含有する粒子又は封入体となる。この様な典型的に凝集しているタンパク質を本分野にて周知の技術を用いて可溶化し、変性し、さらに再度折り畳む。これについては、Protein Folding, Kreuger ら (1990) 136-142 頁、Gierasch 及び King 編、American Association for Advancement of

Science Publication が参照できる。

本発明の GLP-1 誘導体は、製剤的に許容される担体、希釈剤、賦形剤または吸収促進剤と組み合わせて製剤化し、医薬組成物とすることもできる。吸収促進剤には、例えば、キレート剤（例えば、EDTA、クエン酸、サリチル酸塩）、界面活性剤（例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS））、非界面活性剤（例えば、不飽和環状尿素）、および胆汁酸塩（例えば、デオキシコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム）が上げられる。この様な医薬組成物は、製薬分野における周知の方法で製造することができる。また、これらの医薬組成物は、鼻腔等の粘膜投与に適しており、個々に又は他の治療薬と組み合わせて投与することができる。尚、
5 本発明の GLP-1 誘導体は、注射剤、経口剤等、粘膜投与製剤以外の製剤にすることもできる。
10

本発明組成物は、本技術分野における周知の方法を用いて、患者に投与後迅速かつ持続的又は遅延した活性成分の放出を提供する様に製剤化できる。例えば、適切なマクロ分子（例えば、ポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニルピロリドン、酢酸エチレンビニル、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース及び硫酸プロタミン）、あるいはポリエステル、ポリアミノ酸、ハイドロゲル、ポリ（乳酸）又は酢酸エチルビニルコポリマーなどのポリマー物質などを用いて、本発明ペプチドを複合体とするか又は本発明ペプチドを吸着させることにより、放出がコントロールされた製剤を製造することができる。また、これらのポリマー
15 粒子にペプチドを混合する代わりに、例えば、コアセルベーション技術又は界面重合によって製造されたマイクロカプセル、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンからなるマイクロカプセル、コロイド状薬物デリバリーシステム（例えば、リポソーム、アルブミン マイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）、もしくは、マイクロエマルジョン中に、本発明ペプチドを封入することが可能である。
20
25

本発明においては、特開平 8-27018 に従って調製される電荷調整脂肪乳剤に本

発明ペプチドを吸着させることにより、本発明ペプチドの粘膜からの吸収が更に促進された製剤を製造することができる。電荷調整剤としては、各種の酸性リン脂質およびその塩、各種の脂肪酸類およびその塩、胆汁酸類およびその塩等から選択された少なくとも 1 種類の物質が使用される。酸性リン脂質およびその塩は特に限定されないが、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジリンイノシトール、ホスファチジン酸およびその塩を例示することができる。脂肪酸類およびその塩も特に限定されないが、炭素数 6 以上の脂肪酸およびその塩が望ましい。胆汁酸類およびその塩も特に限定されないが、デヒドロコール酸、デオキシコール酸、タウロコール酸およびその塩を例示することができる。電荷調整剤の選択、電荷調整脂肪乳剤濃度の設定により、投与部位に適した本発明品医薬組成物を調製することができる。

本発明の GLP-1 誘導体は、GLP-1 製剤が有効である各種疾患に有効である。即ち、本発明の GLP-1 誘導体は、例えば、インスリン非依存性慢性糖尿病の処置、インスリン依存性慢性糖尿病の処置、肥満の処置、または／及び、食欲抑制等のために、使用することができる。

本発明の GLP-1 誘導体の投与量は、各種疾患の個々の患者に対して当業者によって決定されることが望ましい。しかし、一般的にはその投与量は、1 回体重 kg あたり $1\mu\text{g}$ から 1mg までの範囲内、好ましくは 1 回体重 kg あたり $10\mu\text{g}$ から $100\mu\text{g}$ の範囲内と考えられる。食時直前に使用し、1 日 1 回から 3 回以上投与することも可能である。

以下に実施例、試験例でもって、更に本発明の説明を行う。尚、これらの実施例は本発明の技術的範囲を限定するものではない。

製造例 GLP-1 誘導体の合成

GLP-1 誘導体の合成は、Model 430A ペプチド合成機 (PE-Applied Biosystems, Foster City, CA) による固相合成によって行い、HPLC により精製後、マススペクトルにより合成品を確認した。純度は大部分のものについて 95%以上のものを

使用し、インビトロおよびインビボでの試験を行った。

以下に合成した化合物を示す。GLP-1(7-36)の配列は、His-Ala-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Lys-Gly-Arg (配列番号 2) である (すなわち、GLP-1(7-36)は、
 5 GLP-1(7-35)-Arg と同じである)。例えば、GLP-1(7-36)+Arg-NH₂ とは、天然型 GLP-1(7-36)の C 末端にアミド化 Arg を 1 残基付加したものである。また、[Ser⁸]-GLP-1(7-35)は、2 番目 (8 位に相当) の Ala を Ser に変換し、最後 (36 位に相当) の Arg を削除したものである。

比較製造例 1. GLP-1(7-36)-NH₂ . . . 天然型 GLP-1

10 比較製造例 2. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-NH₂ (配列番号 3)

. . . 8 S-GLP-1 と略す

製造例 1. GLP-1(7-36)+Arg-NH₂ (配列番号 4) . . . GLP-1+1R と略す

製造例 2. GLP-1(7-36)+Arg-Arg-NH₂ (配列番号 5) . . . GLP-1+2R と略す

製造例 3. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-NH₂ (配列番号 6)

15 . . . 8 S-GLP-1+2R と略す

製造例 4. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂ (配列番号 7)

. . . 8 S-GLP-1+3R と略す

製造例 5. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂ (配列番号 8)

. . . 8 S-GLP-1+4R と略す

20 製造例 6. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂ (配列番号 9)

. . . 8 S-GLP-1+5R と略す

製造例 7. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂

(配列番号 10) . . . 8 S-GLP-1+6R と略す

製造例 8. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂

25 (配列番号 11) . . . 8 S-GLP-1+8R と略す

製造例 9. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Lys-Arg-NH₂ (配列番号 12)

・・・8S, des36R-GLP-1+1KR と略す

製造例 10. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Lys-Lys-Arg-NH₂ (配列番号 1 3)

・・・8S, des36R-GLP-1+2KR と略す

製造例 11. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Lys-Lys-Lys-Arg-NH₂ (配列番号 1 4)

5 ・・・8S, des36R-GLP-1+3KR と略す

製造例 12. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Arg-NH₂ (配列番号 1 5)

・・・8S, des36R-GLP-1+5KR と略す

製造例 13. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Arg-NH₂

(配列番号 1 6)・・・8S, des36R-GLP-1+7KR と略す

10 製造例 14. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-

Arg-NH₂ (配列番号 1 7)・・・8S, des36R-GLP-1+10KR と略す

製造例 15. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Lys-Lys-NH₂ (配列番号 1 8)

・・・8S-GLP-1+2K と略す

参考製造例 1. [Ser⁸, Gln²⁶, Asn³⁴]-GLP-1(7-35)-Arg (配列番号 1 9)

15 ・・・8S26Q34N-GLP-1 と略す

参考製造例 2. [Gln²⁶, Asn³⁴]-GLP-1(7-35)-Arg-NH₂ (配列番号 2 0)

・・・26Q34N-GLP-1 と略す

また、これら製造例以外にも、例 16. [Ser⁸, Gln²⁶, Asn³⁴]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂ (配列番号 2 1) (8S26Q34N-GLP-1+4R と略す)、例 17. [Ser⁸, Gln²⁶, Asn³⁴]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-NH₂ (配列番号 2 2) (8S26Q34N-GLP-1+6R と略す)、例 18. [Ser⁸, Gln²⁶, Asn³⁴]-GLP-1(7-35)-Lys-Lys-Lys-Lys-Lys-Arg-NH₂ (配列番号 2 3) (8S26Q34N, des36R-GLP-1+5KR と略す) 等の GLP-1 誘導体が好ましいものと考えられる。

さらに、以上の製造例 1~15、例 16~18 については、C 末端はアミド化 (-NH₂)
25 されているが、非アミド化 (-OH) 体とすることもできる。例えば、製造例 5 の非アミド化 (-OH) 体は、例 19. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg (配列番

号 2' 4) (8S-GLP-1+4R と略す) となる。また、C 末端は Hse とすることもできる。そのようなペプチドとしては、例 20. [Ser⁸]-GLP-1(7-35)-Arg-Arg-Arg-Arg-Hse (配列番号 2 5) (8S-GLP-1+3RHse と略す) を例示することができる。

試験例 1 GLP-1 誘導体のサイクリック AMP 産生活性

5 ヒト GLP-1 受容体の公表された DNA 配列[Graziano ら、Biochem Biophys Res Com 196:141-146(1993)] に基づき発現ベクターを構築した。チャイニーズハムスター 卵巣 CHO-K1 細胞を該ベクターで形質転換し、ヒト GLP-1 受容体を発現する組換え CHO 細胞を得た。

10 ヒト GLP-1 受容体発現細胞を 1×10^4 cells/ml/well で 24 ウエルプレートに植え 込んだ。3 日後アッセイに使用し、緩衝液 (PBS、5.6mM グルコース、1mM イソブチルメチルキサンチン、20 μ M Ro20-1724、0.5%BSA、pH7.4) 中で GLP-1 誘導体 と 37°C で 30 分間インキュベーションした。5 N 塩酸を 10 μ l 加えてインキュベーションを停止した。

15 各種 GLP-1 誘導体と GLP-1 受容体との反応により、細胞内に形成されるサイクリック AMP 生成物は、cAMP-Screen™ system (Applied Biosystems) によるエンザイムイムノアッセイにより測定した。表 1 に各種 GLP-1 誘導体のサイクリック AMP 産生活性を、天然型 GLP-1 の活性を 100%としたときの相対的数値で示した。

表 1

表1 天然型GLP-1のレセプター発現細胞でのサイクリックAMP産生活性を100%とした場合の、GLP-1誘導体の活性

GLP-1誘導体	GLP-1誘導体濃度 (M)		
	1×10^{-11}	1×10^{-10}	1×10^{-9}
GLP-1	100.0	100.0	100.0
GLP-1+1R	7.4	100.6	78.1
GLP-1+2R	72.3	91.9	112.4
8S-GLP-1	97.9	111.4	83.6
8S-GLP-1+2R	56.4	95.5	91.2
8S-GLP-1+3R	-17.0	75.6	101.9
8S-GLP-1+4R	34.0	64.7	105.5
8S-GLP-1+5R	54.3	48.6	75.6
8S-GLP-1+6R	64.9	81.1	80.6
8S-GLP-1+8R	74.5	87.4	95.9
8S,des36R-GLP-1+1KR	100.1	112.9	80.5
8S,des36R-GLP-1+2KR	36.2	88.9	81.6
8S,des36R-GLP-1+3KR	45.0	96.6	86.7
8S,des36R-GLP-1+5KR	7.9	55.3	63.4
8S,des36R-GLP-1+7KR	8.8	55.6	92.6
8S,des36R-GLP-1+10KR	7.5	20.8	55.4
8S-GLP-1+2K	53.2	103.8	88.8

この結果、どの GLP-1 誘導体も *in vitro* でのサイクリック AMP 産生活性を持っていた。しかしながら、アルギニンまたはリジンが多く付加されるにつれて活性の低下傾向が見られた。特にリジンにおいてその傾向が認められる。しかし、粘

5 膜吸収時には、付加されたアルギニンまたはリジンがペプチダーゼにより切除される可能性が高いことから、必ずしも、この *in vitro* での活性が *in vivo* での活性を反映するとは考えられず、このことが後記 *in vivo* 試験の結果となっていると考えられる。

試験例 2 GLP-1 誘導体の粘膜からの吸収に伴う、血糖低下作用およびインスリン分泌促進作用

10 GLP-1 誘導体の粘膜からの吸収増大を、*in vivo* での血糖低下作用およびインスリン分泌促進作用により評価した。すなわち、マウスに GLP-1 誘導体を経鼻投与

し、グルコース負荷後の血糖値の変動を調べる経口耐糖能試験（OGTT）で評価した。

GLP-1 誘導体は蒸留水で 1mM に調製し、-80℃にストックした。試験時に生理食塩水で所定の濃度に希釈して使用した。

- 5 マウスはエーテルを用いて軽麻酔した。マイクロピペットを用いて 20 μ l の GLP-1 誘導体溶液を、チップの先から直接マウスの鼻にゆっくりと放出した。このとき GLP-1 誘導体溶液は、マウスの呼吸により鼻から吸引された。GLP-1 誘導体を経鼻投与して 5 分後、5%グルコース溶液を 10ml/kg の割合でゾンデにより経口投与した。
- 10 血糖値は、試験直前とグルコース投与 5, 10, 20 分後に、尾先端部を切除した傷口から血液数 μ l を揉み出し、小型血糖値測定機（グルテストエース、(株)三和化学研究所）を用いて測定した。GLP-1 誘導体投与前の血糖値からの上昇分の曲線下面積（AUC 0-20 分）を個々のマウスについて算出した。

また、血中インスリン値は、グルコース投与 5 分後にヘパリン処理したガラス
- 15 キャピラリーを用いて眼窩静脈叢より 75 μ l 採血し、遠心分離により得た血漿を用いて EIA 法（レビスマウスインスリンキット、(株)シバヤギ）により測定した。

各 GLP-1 誘導体投与群の血糖値と血中インスリン値を、平均値と標準誤差で表 2 に示した。

表 2

表2 GLP-1誘導体投与時の、OGTT試験における血糖値と血中インスリン値

投与検体	投与量 (nmol/mouse)	血糖値 (曲線下面積(AUC _{0-20min})) (mg/dl・min)			血中インスリン値 (グルコース投与後5分値)(ng/mL)		
生理食塩水	0	712	±	103	632	±	107
天然型GLP-1	1.07	697	±	94	662	±	91
天然型GLP-1	10.7	399	±	35	743	±	147
8S-GLP-1	1.07	624	±	89	1026	±	199
8S-GLP-1	10.7	291	±	66	1289	±	165
8S-GLP-1+2R	1.07	535	±	58	957	±	86
8S-GLP-1+3R	1.07	509	±	92	1359	±	318
8S-GLP-1+4R	1.07	388	±	54	1713	±	430
8S-GLP-1+5R	1.07	483	±	26	1504	±	250
8S-GLP-1+6R	1.07	559	±	27	1633	±	449
8S-GLP-1+8R	1.07	487	±	32	1882	±	402
8S,des36R-GLP-1+1KR	1.07	611	±	51	1349	±	244
8S,des36R-GLP-1+2KR	1.07	564	±	52	1243	±	309
8S,des36R-GLP-1+3KR	1.07	557	±	53	1176	±	233
8S,des36R-GLP-1+5KR	1.07	404	±	71	2229	±	346
8S,des36R-GLP-1+7KR	1.07	457	±	69	1604	±	344
8S,des36R-GLP-1+10KR	1.07	492	±	106	2379	±	520
8S-GLP-1+2K	1.07	598	±	63	862	±	150

この結果、8 S-GLP-1+4R および 8S, des36R-GLP-1+5KR の GLP-1 誘導体において、最も強い血糖低下作用がみられた。また、8 S-GLP-1+4R 以上にアルギニンを付加した誘導体、あるいは 8S, des36R-GLP-1+5KR 以上にリジンを付加した誘導体において、最も高いインスリン分泌促進作用がみられた。このとき、天然型 GLP-1 に比べて 10 分の 1 量で同等の効果を示していることから、これらの GLP-1 誘導体は、天然型 GLP-1 に比べて 10 倍吸収が増大したと考えられた。

試験例 3 電荷調整脂肪乳剤の GLP-1 誘導体の粘膜吸収に対する作用

- 10 試験例 2 と同様の方法で経口耐糖能試験を行い、電荷調整脂肪乳剤の併用による GLP-1 誘導体の血糖値低下作用およびインスリン分泌促進作用を調べた。使用した電荷調整脂肪乳剤は特開平 8-27018 にしたがって調製し、ホスファチジルグリセロール (ナトリウム塩) 2% (w/w)、中性油 8% (w/w)、水 90% (w/w) を用いて、最終濃度 8% 電荷調整脂肪乳剤を得た。

8%電荷調整脂肪乳剤溶液 50 μ l、1mM 8 S-GLP-1+5R 溶液 3.56 μ l、蒸留水 146.4 μ l を混和して、最終濃度 0.0178mM 8 S-GLP-1+5R を含む 2%電荷調整脂肪乳剤溶液を調製した。比較対照には、2%電荷調整脂肪乳剤溶液を含まない 0.534mM 天然型 GLP-1 溶液（8 S-GLP-1+5R に比べて 30 倍量）、2%電荷調整脂肪乳剤溶液を含まない 0.0178mM 8 S-GLP-1+5R 溶液、および生理食塩水を用いた。

マウスはエーテルを用いて軽麻酔した。マイクロピペットを用いて 20 μ l の GLP-1 誘導体溶液を、チップの先から直接マウスの鼻にゆっくりと放出した。GLP-1 誘導体を経鼻投与して 5 分後、5%グルコース溶液を 10ml/kg の割合でゾンデにより経口投与した。

10 血糖値は、試験直前とグルコース投与 10, 20, 30 分後に、尾先端部を切除した傷口から血液数 μ l を採み出し、小型血糖値測定機（グルテストエース、(株)三和化学研究所）を用いて測定した。GLP-1 誘導体投与前の血糖値からの上昇分の曲線下面積（AUC 0-30 分）を個々のマウスについて算出した。

また、血中インスリン値は、グルコース投与 10 分後にヘパリン処理したガラスキャピラリーを用いて眼窩静脈叢より 75 μ l 採血し、遠心分離により得た血漿を用いて EIA 法（レビスマウスインスリンキット、(株)シバヤギ）により測定した。

各 GLP-1 誘導体投与群の血糖値と血中インスリン値を、平均値と標準誤差で表 3 に示した。

表 3

表3 電荷調整脂肪乳剤を併用したGLP-1誘導体投与時の、OGTT試験における血糖値と血中インスリン値

投与検体	投与量 (nmol/mouse)	血糖値 (曲線下面積(AUC _{0-30min})) (mg/dl \cdot min)			血中インスリン値 (グルコース投与後10分値)(ng/mL)		
生理食塩水	0	2122	\pm	198	251	\pm	12
天然型 GLP-1	10.7	1533	\pm	111	377	\pm	41
8S-GLP-1+5R	0.357	2025	\pm	176	506	\pm	34
電荷調整脂肪乳剤併用 8S-GLP-1+5R	0.357	1526	\pm	354	560	\pm	81

20 この結果、電荷調整脂肪乳剤を併用した 8 S-GLP-1+5R は、電荷調整脂肪乳剤を併用しない天然型 GLP-1 の 30 分の 1 量で、天然型 GLP-1 と同等の血糖低下作用

を示した。即ち、電荷調整脂肪乳剤により 8 S-GLP-1+5R の吸収が増大し、より低濃度で効果が発揮された。

試験例 4 GLP-1 誘導体 8S26Q34N-GLP-1 の活性評価

試験例 1 の方法に従がって、GLP-1 誘導体 8S26Q34N-GLP-1 のインビトロにおけるサイクリック AMP 産生活性を測定した。アミノ酸置換後も活性を維持していた (表 4)。

表 4

8S26Q34N-GLP-1のサイクリックAMP産生活性

8S26Q34N-GLP-1濃度 (log M)	cAMP産生量 (pmol/10 ⁵ cell/30min)
-12	0.6
-11	4.7
-10	24.2
-9	76.1
-8	79.2

また、マウスランゲルハンス島を用いて、16.7mM グルコース存在下 (高血糖条件) における 30 分間のインスリン分泌活性を調べたところ、GLP-1 誘導体 8S26Q34N-GLP-1 は天然型 GLP-1 に比べて活性が強い傾向を示した (表 5)。

表 5

マウスランゲルハンス島を用いた、16.7mMグルコース存在下 8S26Q34N-GLP-1のインスリン分泌活性

アッセイ濃度 (log M)	インスリン分泌量(ng/islet/30min)	
	天然型GLP-1	8S26Q34N-GLP-1
0	2.61	
-10	4.11	3.64
-9	5.11	6.61
-8	6.71	9.85

更に、マウスにおける血糖低下作用を、マウスに GLP-1 誘導体を皮下投与した 5 分後、尾静脈からのグルコース 0.5g/kg 負荷を行うことにより調べた。GLP-1 誘導

体 8S26Q34N-GLP-1 は濃度依存的な血糖低下がみられ、その作用は天然型 GLP-1 より強かった(表 6)。

表 6

8S26Q34N-GLP-1誘導体のマウス血糖低下作用

投与量(μ g/kg)	グルコース負荷20分後における Δ 血糖値(mg/dl)	
	天然型GLP-1	8S26Q34N-GLP-1
0	123	
5	119	110
10	103	95
20	75	21

5 本試験の結果は、参考製造例 1 の GLP-1 誘導体が、GLP-1 活性を保持していることを示すものである。表 1 の試験結果を合わせて考えると、この GLP-1 誘導体の C 末端側に数個のアルギニンまたはノ及びリジンを付加しても、やはり GLP-1 活性を保持していると結論付けることができる。

試験例 5 GLP-1 誘導体 8S-GLP-1 のジペプチジルペプチダーゼ IV (DPPIV) に対する耐性の評価

10 500pM GLP-1 誘導体 8S-GLP-1 を 40μ U/ μ l ジペプチジルペプチダーゼ IV と混合し、37℃にて 60 分間反応させた。その後、2 倍量のエタノールで抽出し、遠心エバポレーターにて乾固した。得られた乾固物を 1%BSA 含有蒸留水に溶解し、試験例 1 に従ってサイクリック AMP 産生活性を測定し、残存活性(%)を算出した。

15 この結果、ジペプチジルペプチダーゼ IV による処理なしと処理ありで活性に違いがなく、本 GLP-1 誘導体がジペプチジルペプチダーゼ IV に対して耐性であることがわかった。したがって 8 位をセリンに置換することにより、GLP-1 誘導体はジペプチジルペプチダーゼ IV 耐性を獲得できる(表 7)。

表 7

ペプチド	残存活性(%)	
	DPPIV	
	-	+
8S-GLP-1	100%	101%
天然型GLP-1	100%	25%

試験例 6 GLP-1 誘導体 26Q34N-GLP-1 のトリプシンに対する耐性の評価

参考製造例 2 の GLP-1 誘導体 26Q34N-GLP-1 を、50mM 炭酸水素アンモニウム pH 7.8 に 500 μ g/ml の濃度になるように溶解した。この溶液 100 μ l に、500 μ g/ml

5 トリプシン溶液 (Promega Cat.No. V5113) を 5 μ l 加えて、37℃、1 時間反応させた。反応停止は 71.5%エタノールを 1200 μ l (final 65%) を加えて行い、4℃で 5 分間の 15,000rpm 遠心により上清を回収し、エバポレーションした。乾固物を蒸留水に溶解し、試験例 1 の方法で cAMP 活性を測定し、残存活性(%)を求めた。

この結果、トリプシン処理なしと処理ありで活性に違いがなく、本 GLP-1 誘導

10 体がトリプシンに耐性であることがわかった (表 8)。

表 8

ペプチド	残存活性(%)	
	トリプシン	
	-	+
26Q34N-GLP-1	100%	94.8%

この結果は、GLP-1 誘導体の 26 位をグルタミンに、34 位をアスパラギンに置換することにより、GLP-1 誘導体がトリプシン耐性を獲得することを示す。これにより、この GLP-1 誘導体の C 末端側に数個のアルギニンまたは／及びリジンを付加した GLP-1 誘導体も、やはりトリプシン耐性を有すると結論付けることができる。

15

産業上の利用の可能性

GLP-1 は現在皮下注射で臨床開発が進められている。この原因には、GLP-1 がペプチドであり、経口投与では吸収されないことが上げられる。本発明品はこの点を改善し、注射以外での投与を可能にする。GLP-1 を用いた糖尿病治療は長期間にわたることが予想され、患者にとって繰り返しの注射から開放されるメリットは大きい。

請 求 の 範 囲

1. GLP-1(7-35)のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換及び／または付加された配列からなり、かつ GLP-1 活性を有するペプチドの C 末端に Waa-(Xaa) n -Yaa (Waa は Arg または Lys、 Xaa は Arg または Lys、 n は 0～14 の整数、 Yaa は Arg、Arg-NH₂、Lys、Lys-NH₂ または Hse) が付加されたペプチド。
5
2. GLP-1 アミノ酸配列の 8 位が Ser に置換されていることを特徴とする、請求項 1 に記載のペプチド。
3. GLP-1 アミノ酸配列の 2 6 位が Gln に、3 4 位が Asn に置換されていることを特徴とする、請求項 1 に記載のペプチド。
10
4. n が 1～9 の整数である、請求項 1 に記載のペプチド。
5. n が 3～5 の整数である、請求項 1 に記載のペプチド。
6. 一般式、[Ser⁸, Gln²⁶, Asn³⁴]-GLP-1(7-35)-(Arg) n -Yaa
式中、 n は 4～6 の整数、 Yaa は Arg または Arg-NH₂、 で示される、請求項
15 1 に記載のペプチド。
7. 天然型 GLP-1 よりも高い粘膜吸収率を有することを特徴とする、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のペプチド。
8. 請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のペプチドを有効成分として含む医薬組成物。
- 20 9. 表面電荷をマイナスに調整した脂肪乳剤を含有していることを特徴とする、請求項 8 に記載の医薬組成物。
10. 経粘膜投与、特に経鼻投与で用いることを特徴とする、請求項 8 または 9 に記載の医薬組成物。
11. インスリン非依存性慢性糖尿病の処置、インスリン依存性慢性糖尿病の
25 処置、肥満の処置、又は／及び食欲抑制のための、請求項 8 または 9 に記載の医薬組成物。

要 約 書

本発明は、GLP-1 (7-35) のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換及び／または付加された配列からなり、かつ GLP-1 活性を有するペプチドの C 末端に Waa-(Xaa) n -Yaa (Waa は Arg または Lys、Xaa は Arg または Lys、
5 n は 0～14 の整数、Yaa は Arg、Arg-NH₂、Lys、Lys-NH₂ または Hse) が付加された GLP-1 誘導体である。本誘導体は、粘膜からの吸収性が高い誘導体である。本発明では更に、GLP-1 アミノ酸配列の 8 位を Ser に置換することでジペプチジルペプチダーゼ IV に対する耐性を付加、また 26 位を Gln に 34 位を Asn に置換することでトリプシン耐性を付加することができる。

- 10 本発明の GLP-1 誘導体は、表面電荷をマイナスに調整した電荷調整脂肪乳剤を用いて製剤化することにより、更にその粘膜吸収率を高めることができる。

1/18

SEQUENCE LISTING

<110> SANWA KAGAKU KENKYUSHO CO., LTD.

<120> GLP-1 derivatives and the use

<130> JP0304SKK

<150> JP 2002-299283

<151> 2002-10-11

<160> 25

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> GLP1(7-35)

<400> 1

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1

5

10

15

2/18

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly
20 25

<210> 2
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> GLP1(7-36)

<400> 2

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 3
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 8S-GLP1

<400> 3

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg
			20					25					30

<210> 4

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> GLP1+1R

<400> 4

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Arg
			20					25					30	

<210> 5

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> GLP1+2R

<400> 5

His	Ala	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Arg	Arg
			20					25					30		

<210> 6

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-GLP1+2R

<400> 6

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

5/18

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Arg	Arg
			20					25					30		

<210> 7

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-GLP1+3R

<400> 7

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Arg	Arg
			20					25					30		

Arg

<210> 8

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-GLP1-4R

<400> 8

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Arg	Arg
			20					25					30		

Arg Arg

<210> 9

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-GLP1+5R

<400> 9

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

7/18

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Arg Arg
20 25 30

Arg Arg Arg
35

<210> 10
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> 8S-GLP1+6R

<400> 10

His Ser Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Arg Arg
20 25 30

Arg Arg Arg Arg

35

<210> 11

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-GLP1-8R

<400> 11

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Arg	Arg
			20					25					30		

Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
					35

<210> 12

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

9/18

<220>

<223> 8S-des36R-GLP1+1KR

<400> 12

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Lys	Arg
			20					25					30	

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-des36R-GLP1+2KR

<400> 13

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Lys	Lys	Arg
			20					25					30		

<210> 14

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-des36R-GLP1+3KR

<400> 14

His Ser Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1

5

10

15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Lys Lys Lys

20

25

30

Arg

<210> 15

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-des36R-GLP1+5KR

11/18

<400> 15

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Lys	Lys	Lys
			20					25					30		

Lys	Lys	Arg
		35

<210> 16

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-des36R-GLP1+7KR

<400> 16

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Lys	Lys	Lys
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

12/18

20

25

30

Lys Lys Lys Lys Arg

35

<210> 17

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-des36R-GLP1+10KR

<400> 17

His Ser Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1

5

10

15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Lys Lys Lys

20

25

30

Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Arg

35

40

<210> 18

<211> 32
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> 8S-GLP1+2K

<400> 18

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Lys	Lys
			20					25					30		

<210> 19
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> 8S26Q34N-GLP1

<400> 19

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

14/18

Gln Ala Ala Gln Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Asn Gly Arg

20

25

30

<210> 20

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 26Q34N-GLP1

<400> 20

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1

5

10

15

Gln Ala Ala Gln Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Asn Gly Arg

20

25

30

<210> 21

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S26Q34N-GLP1+4R

<400> 21

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

Gln	Ala	Ala	Gln	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Asn	Gly	Arg	Arg	Arg
			20					25					30		

Arg Arg

<210> 22

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S26Q34N-GLP1-6R

<400> 22

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

Gln	Ala	Ala	Gln	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Asn	Gly	Arg	Arg	Arg
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

16/18

20

25

30

Arg Arg Arg Arg

35

<210> 23

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S26Q34N-des36R-GLP1-5KR

<400> 23

His Ser Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly

1

5

10

15

Gln Ala Ala Gln Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Asn Gly Lys Lys Lys

20

25

30

Lys Lys Arg

35

<210> 24

17/18

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-GLP1-4R

<400> 24

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Arg	Arg
			20					25					30		

Arg Arg

<210> 25

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> 8S-GLP1+3RHse

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Xaa is Homoserine.

<400> 25

His	Ser	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	

Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Arg	Arg
			20					25					30		

Arg Xaa